

文章编号:1001-6880(2016)5-0735-06

# 响应面法优化番木瓜籽中苄基硫代葡萄糖苷的提取工艺

赵珂,王勇,姜月霞,黄艳,李泽友\*

海南医学院药学院,海口 571199

**摘要:**以番木瓜籽中苄基硫代葡萄糖苷(BG)的含量为指标,采用HPLC法测定,在单因素试验基础上,通过响应面分析法,考察乙醇浓度、料液比、提取时间及提取温度对BG提取含量的影响,并利用Design Expert 8.0.6分析软件对试验数据进行分析,获得最佳提取工艺条件为:乙醇浓度73%,料液比1:13 g/mL,提取时间70 min,提取温度83 °C,提取次数3次,在此条件下经三次平行实验验证,提取BG平均含量达到1.675%,与理论最优值相差较小,表明优选的提取工艺稳定可行,为番木瓜资源的开发利用提供了参考。

**关键词:**苄基硫代葡萄糖苷;高效液相色谱法;响应面分析法;番木瓜;乙醇回流提取

中图分类号:R284

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.5.017

## Optimization of Extraction of Benzyl Glucosinolate from the Seeds of *Carica papaya* L. by Response Surface Methodology

ZHAO Ke, WANG Yong, JIANG Yue-xia, HUANG Yan, LI Ze-you\*

School of Pharmaceutical Sciences, Hainan Medical University, Haikou 571199, China

**Abstract:** The content of benzyl glucosinolate (BG) from the seeds of *Carica papaya* L. was determined by HPLC. On the basis of the results of single factor tests, response surface methodology was adopted to investigate the effects of ethanol concentration, solid-liquid ratio, extraction duration and extraction temperature on the extraction yield of BG. The results were analyzed by Design Expert 8.0.6 software. The optimal extraction conditions of BG were as follows: ethanol concentration of 73%, solid-liquid ratio of 1:13 g/mL, extraction duration of 70 min, extraction temperature of 83 °C, for 3 times. Under these conditions, the content of BG reached 1.675%, which had small difference from the theoretical optimal value. The result proved that the optimized extraction technology was stable and reliable. It provided a reference for the development and utilization on the resources of *C. papaya*.

**Key words:** benzyl glucosinolate; HPLC; response surface methodology; *Carica papaya* L.; ethanol reflux extraction

番木瓜(*Carica papaya* L.)又名万寿果,属番木瓜科番木瓜属植物,在我国主要分布在海南、广东、广西、台湾、云南、福建等地,为南方水果。番木瓜中含有木瓜蛋白酶、萜类化合物、糖分、黄酮类、色素、生物碱等,具有抗菌、抗癌、抗肿瘤、免疫调节、保肝等多种功效<sup>[1]</sup>。此外,番木瓜籽中含有丰富的苄基硫代葡萄糖苷(benzyl glucosinolate,BG),可以在芥子酶的作用下水解产生具有防癌抗癌作用的异硫氰酸苄酯(benzyl isothiocyanate,BITC)<sup>[2,3]</sup>。有研究表明,BG在番木瓜中除了成熟的果肉以外其他部位均存在,且以种子中的含量最高<sup>[4,5]</sup>。通常人们食用的是番木瓜果肉,而番木瓜籽通常是废弃物。为了

开发利用番木瓜籽,实现变废为宝,本研究以BG含量为指标,在单因素考察基础上,采用响应面分析法优选提取工艺,确定采用乙醇回流方法提取番木瓜籽中的BG,为BG在医药和保健品方面的开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

番木瓜籽,从水果市场搜集所得,放入烘箱,于110 °C灭酶活1 h,水洗后40 °C烘干,粉碎,过筛,放入密封袋储藏备用。

苄基硫代葡萄糖苷(BG)对照品(批号:12030606,购买于ITW Company);水为超纯水;甲酸、乙腈为色谱纯;其余试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Fisher); HC-

150T2型粉碎机(永康市绿可食品机械有限公司);GZX-9240ME型数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司);HH-W420型恒温水浴锅(江苏省金坛市医疗仪器厂);SHZ-D(III)型循环水式真空泵(河南省予华仪器有限公司);SY-180型超声仪(上海宁商超声仪器有限公司);AL104型电子天平(梅特勒-托利多仪器公司)。

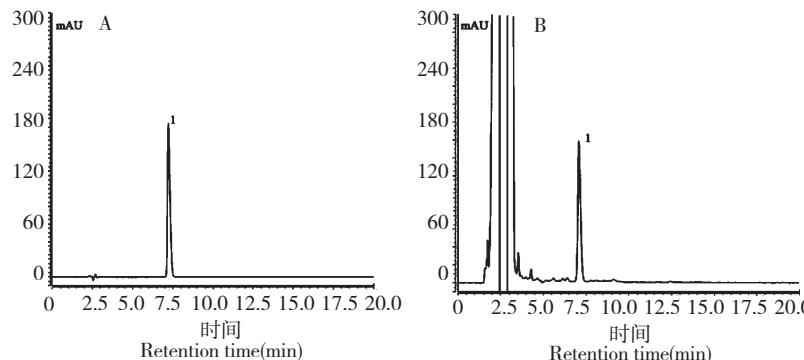


图1 苯基硫代葡萄糖苷对照品(A)和供试品(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of benzyl glucosinolate standard(A) and sample(B)

### 1.3.2 标准曲线的绘制

精密称取BG对照品10.5 mg,置于2 mL量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,摇匀,配置成5.25 mg/mL的对照品储备液。精密吸取对照品储备液0.1 mL置于1 mL的容量瓶中,用水定容,摇匀,配置成0.525 mg/mL的对照品溶液,0.45 μm有机滤膜过滤,按1.3.1项下色谱条件测定,分别自动进样1、3、5、10、20、40 μL记录峰面积,以进样含量(X)对峰面积(Y)进行回归,绘制BG的标准曲线,得回归方程 $Y=16.455X+0.4589(R^2=0.9997)$ ,线性范围为0.525~10.5 μg。

### 1.3.3 单因素试验考察

#### 1.3.3.1 脱脂预处理

精密称取粉碎的番木瓜籽约5.0 g,共2份,其中一份以1:4加入正己烷,室温脱脂1 h,抽滤,滤渣室温晾干。另一份不脱脂。然后分别加入50 mL 80%的乙醇,在80 °C水浴中加热回流30 min,重复两次,合并提取液,抽滤,用相应的乙醇浓度定容,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,按1.3.1项下色谱条件测定。

#### 1.3.3.2 乙醇浓度

精密称取粉碎的番木瓜籽约5.0 g,共5份,分别加入50 mL 50%、60%、70%、80%、90%的乙醇,按1.3.3.1项下方法处理,按1.3.1项下色谱条件

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 色谱条件

色谱柱为Waters Symmetry Shield™ RP C18柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(35:65),含0.3%甲酸;流速:1.0 mL/min;检测波长:225 nm;柱温:26 °C,进样量:5 μL,见图1。

测定。

### 1.3.3.3 料液比

精密称取粉碎的番木瓜籽约5.0 g,共4份,分别加入25、50、75、100 mL的80%的乙醇,按1.3.3.1项下方法处理,按1.3.1项下色谱条件测定。

### 1.3.3.4 提取温度

精密称取粉碎的番木瓜籽约5.0 g,共4份,加入50 mL 80%的乙醇,分别在75 °C、80 °C、85 °C、90 °C水浴中加热回流30 min,按1.3.3.1项下方法处理,按1.3.1项下色谱条件测定。

### 1.3.3.5 提取时间

精密称取粉碎的番木瓜籽约5.0 g,共4份,加入50 mL 80%的乙醇,分别在80 °C水浴中加热回流30、60、90、120 min,按1.3.3.1项下方法处理,按1.3.1项下色谱条件测定。

### 1.3.3.6 提取次数

精密称取粉碎的番木瓜籽约5.0 g,共4份,加入50 mL 80%的乙醇,分别提取1~4次,合并滤液,按1.3.3.1项下方法处理,按1.3.1项下色谱条件测定。

### 1.3.4 响应面分析试验<sup>[6-9]</sup>

精密称取粉碎的番木瓜籽29份,每份5.0 g,在单因素试验基础上,固定提取次数3次,选取乙醇浓度,料液比,提取时间,提取温度为考察因素,以提取

BG 含量为响应值,根据 Box-Behnken 设计原则安排

试验,因素水平见表 1,利用 Design Expert 8.0.6 软

件对实验数据进行分析。

表 1 Box-Behnken 试验因素水平  
Table 1 Factors and levels of Box-Behnken experiments

因素 Factors	水平编码 Level		
	-1	0	1
(A) 乙醇浓度 Ethanol concentration(%)	60	70	80
(B) 料液比 Solid-liquid ratio(g/mL)	1:5	1:10	1:15
(C) 提取时间 Extraction duration( min )	30	60	90
(D) 提取温度 Extraction temperature( °C )	75	80	85

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素考察试验结果

由图 2a 可知,未脱脂提取液中的 BG 含量明显比脱脂处理的 BG 含量高,故以下考察均为未脱脂。由图 2b 可知,当乙醇浓度由 50% 升高至 80% 时,提取液中 BG 的含量逐渐增加,当继续升高到 90% 时,提取含量反而下降。因此,80% 的乙醇较适合 BG 的提取。由图 2c 可知,随着料液比的增加,提取液中的 BG 含量逐渐增高,当料液比增加到 1:15、1:20 时,提取液中 BG 的含量较高且相近。因此,为了满

足较高提取含量和节约溶剂损耗两方面的因素,同时考虑到下一步浓缩回收的工作量,选择料液比 1:15 较适宜。由图 2d 可知,随着温度增加,BG 含量逐渐增高,温度为 80 ℃ 含量达到最高,之后随着温度增加,BG 含量减少,可能是高温会促使 BG 的降解。故提取 BG 较适合的温度为 80 ℃。由图 2e 知,提取时间越长,提取的 BG 含量越高,因此,考虑到较高的提取量和生产效益等因素,选择提取时间 60 min。由图 2f 可知,随着提取次数增多,BG 提取的含量逐渐升高且考虑到溶剂消耗和生产效益等方面的因素,故提取次数为 3 次较合适。

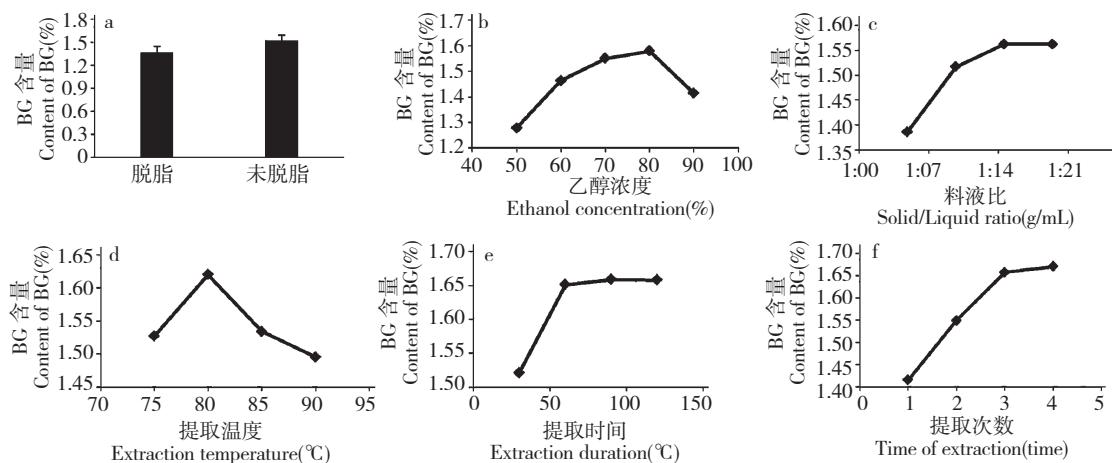


图 2 脱脂预处理(a)、乙醇浓度(b)、料液比(c)、提取温度(d)、提取时间(e)、提取次数(f)对 BG 含量的影响

Fig. 2 Effects of defattening pretreatment (a), ethanol concentration (b), solid-liquid ratio (c), extraction temperature (d), extraction duration (e) and extraction times (f) on the yield of BG

### 2.2 响应面分析法优化

在单因素试验基础上,固定提取次数 3 次,以乙醇浓度(A)、料液比(B)、提取时间(C)、提取温度(D)为考察因素,以提取 BG 含量为响应值,设计 29 次实验,结果见表 2。

应用 Design Expert 8.0.6 软件对试验数据进行回归分析,得多元二次回归方程为  $Y = 1.64 + 0.018A + 0.065B + 0.070C + 0.017D + 0.011AB + 0.015AC + 0.012AD - 4.000 \times 10^{-3}BC + 0.041BD - 0.071A^2 - 0.093B^2 - 0.096C^2 - 0.030D^2$ , 回归模型方差分析见表 3。

表 2 Box-Behnken 设计及试验结果  
Table 2 Design and results of Box-Behnken experiments

试验号 No.	A (%)	B (g/mL)	C (min)	D (°C)	BG 含量 Content of BG(%)
1	-1	-1	0	0	1.355
2	1	-1	0	0	1.397
3	-1	1	0	0	1.482
4	1	1	0	0	1.568
5	0	0	-1	-1	1.409
6	0	0	1	-1	1.613
7	0	0	-1	1	1.364
8	0	0	1	1	1.568
9	-1	0	0	-1	1.517
10	1	0	0	-1	1.525
11	-1	0	0	1	1.530
12	1	0	0	1	1.587
13	0	-1	-1	0	1.289
14	0	1	-1	0	1.457
15	0	-1	1	0	1.454
16	0	1	1	0	1.606
17	-1	0	-1	0	1.483
18	1	0	-1	0	1.467
19	-1	0	1	0	1.513
20	1	0	1	0	1.555
21	0	-1	0	-1	1.494
22	0	1	0	-1	1.490
23	0	-1	0	1	1.523
24	0	1	0	1	1.683
25	0	0	0	0	1.675
26	0	0	0	0	1.607
27	0	0	0	0	1.619
28	0	0	0	0	1.622
29	0	0	0	0	1.689

由表 3 可知, 模型的  $P$  值小于 0.05, 表明该模型显著, 模型的失拟项大于 0.05, 失拟项不显著, 说明模式可靠, 用此模型来分析和预测乙醇回流提取番木瓜籽中 BG 的效果是可行的, 具有参考性。各因素对 BG 提取含量影响的大小顺序为: 提取时间 (C) > 料液比 (B) > 乙醇浓度 (A) > 提取温度 (D)。从方差分析结果和图 3 可以看出, 一次项 B, C, 二次项  $A^2, B^2, C^2$  对 BG 提取的影响是显著的, 一次项

A, D, 二次项  $D^2$ , 交互项 AB, AC, AD, BC, BD, CD 对 BG 提取的影响不显著, 但各因素与 BG 含量呈较明显的二次抛物线关系, 表明回归方程拟合性较好, 同时表明各交互因素在响应值 (BG 含量) 存在最大值。

### 2.3 验证试验

由 Design Expert 8.0.6 软件分析, 可得出番木瓜籽中 BG 提取的最优条件。结果显示, BG 的最佳

表 3 回归模型方差分析  
Table 3 Variance analysis of regression model

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> value	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	显著性 Significance
模型 Model	0.23	14	0.017	5.03	0.0023	*
A	$3.997 \times 10^{-3}$	1	$3.997 \times 10^{-3}$	1.20	0.2920	
B	0.050	1	0.050	14.98	0.0017	*
C	0.059	1	0.05	17.64	0.0009	* *
D	$3.571 \times 10^{-3}$	1	$3.571 \times 10^{-3}$	1.07	0.3182	
AB	$4.840 \times 10^{-4}$	1	$4.840 \times 10^{-4}$	0.15	0.7089	
AC	$8.410 \times 10^{-4}$	1	$8.410 \times 10^{-4}$	0.25	0.6232	
AD	$6.002 \times 10^{-4}$	1	$6.002 \times 10^{-4}$	0.18	0.6777	
BC	$6.400 \times 10^{-5}$	1	$6.400 \times 10^{-5}$	0.019	0.8918	
BD	$6.724 \times 10^{-3}$	1	$6.724 \times 10^{-3}$	2.02	0.1774	
CD	$2.498 \times 10^{-16}$	1	$2.498 \times 10^{-16}$	$7.495 \times 10^{-14}$	1.0000	
$A^2$	0.033	1	0.033	9.77	0.0074	*
$B^2$	0.057	1	0.057	17.01	0.0010	* *
$C^2$	0.060	1	0.060	17.93	0.0008	* *
$D^2$	$5.981 \times 10^{-3}$	1	$5.981 \times 10^{-3}$	1.79	0.2017	
残差 Residual	0.047	14	$3.333 \times 10^{-3}$			
失拟项 Lack of fit	0.041	10	$4.121 \times 10^{-3}$	3.02	0.1488	
纯误差 Pure Error	$5.451 \times 10^{-3}$	4	$1.363 \times 10^{-3}$			
总体 Cor Total	0.28	28				

注: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$ 。

Note: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$ .

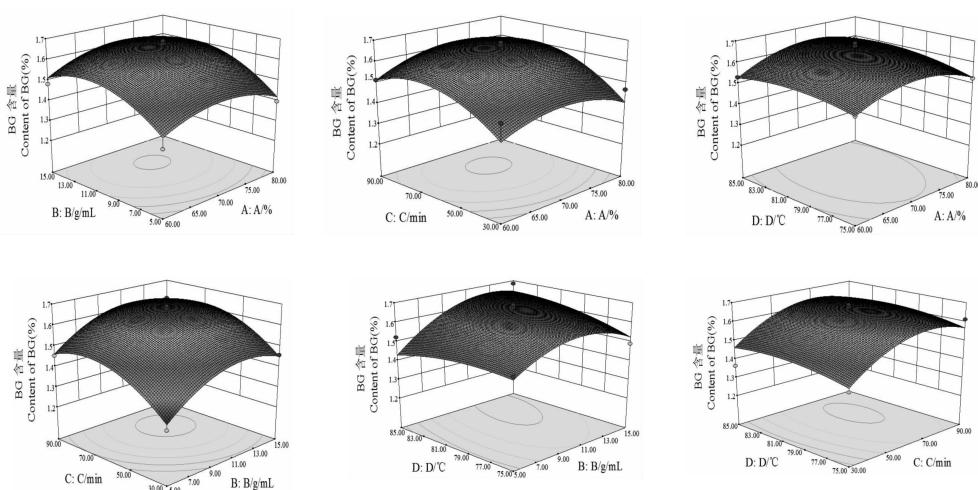


图 3 交互作用对 BG 含量影响的响应图

Fig. 3 Response surface plots showing the interaction of factors on the content of BG

提取条件如下:乙醇浓度为 72.64%, 料液比为 1:12.51 g/mL, 提取时间为 71.21 min, 提取温度为 83.38 °C, 提取 BG 含量预测值为 1.680%。考虑到

实验的可操作性,将优化条件修正为:乙醇浓度为 73%, 料液比为 1:13 g/mL, 提取时间为 70 min, 提取温度为 83 °C。在此条件下进行 3 次平行实验,所

得提取 BG 的平均含量为 1.675% ,与预测值接近,表明优选的工艺条件稳定可行。

### 3 讨论

#### 3.1 含量测定的方法学考察

对含量测定方法进行了考察,精密度试验结果测定 BG 色谱峰峰面积的 RSD 为 0.22% ,表明仪器精密度良好。稳定性试验结果显示 BG 峰面积的 RSD 为 0.12% ,说明供试品溶液在 24 h 内稳定。重复性试验结果显示 BG 平均含量的 RSD 为 2.0% ,说明重复性良好。加样回收率试验结果显示平均回收率 98.62% ,RSD 2.85% ,表明方法准确度良好。实验证明用 1.3.1 项下色谱条件测定 BG 含量是可行的。

#### 3.2 工艺条件考察

对乙醇回流法提取番木瓜籽中 BG 的各个相关因素进行了研究,在单因素试验的基础上,采用响应面分析法优选 BG 的提取工艺参数,并通过验证试验得到了最佳的工艺条件,即乙醇浓度 73% ,料液比 1:13 g/mL,提取时间 70 min,提取温度 83 °C ,提取次数 3 次,从番木瓜籽中提取 BG 的含量为 1.675% 。

预试验分别以纯水、30% 乙醇、50% 乙醇、75% 乙醇、75% 甲醇、甲醇回流提取和超声提取考察提取 BG 含量的大小,结果表明回流提取的 BG 含量明显高于超声提取,75% 乙醇和 75% 甲醇提取 BG 含量相差不大,且都高于其他溶剂的提取结果,考虑到乙醇毒性较小,故本实验选择乙醇回流提取。

在和响应面同样试验因素水平下也进行了正交试验的考察对比,结果得到最优的提取工艺条件为乙醇浓度 70% ,料液比 1:15 g/mL,提取时间 90 min,提取温度 85 °C ,提取次数 3 次,提取 BG 含量为 1.513% ,这与响应面分析法得到的最优提取工艺参数和提取含量差别不大。本文通过响应面分析法优选 BG 的提取工艺参数,可在连续范围内进行分析,具有重复性优和提取含量高等特点,为工业化生产提供参考依据。海南是番木瓜的主产区,对番

木瓜种子中 BG 进行研究开发,是变废为宝,提升番木瓜产业的一种良好途径。

#### 参考文献

- Wang XY(汪修意),Hu CY(胡长鹰),Yu B(虞兵),et al, Research progress in biological activity ingredients of papaya. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2013,34:394-398.
- Zhu MY(朱明月),Li W(李伟),Lu Y(鲁琰),et al. Benzyl isothiocyanate induces apoptosis of hepatocarcinoma cells. *World J Chin Digest*(世界华人消化杂志),2014,22:2277-2284.
- Li ZY,Wang Y,Shen WT,et al. Content determination of benzyl glucosinolate and anti-cancer activity of its hydrolysis product in *Carica papaya* L. *Asian Pac J Trop Med*,2012,5:231-233.
- Li ZY(李泽友),Shen WT(沈文涛),Yan P(言普),et al. Analysis of benzyl isothiocyanate and its precursor-benzyl glucosinolate in *Carica papaya* L. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志),2011,31:678-681.
- Nakamura Y,Yoshimoto M,Murata Y,et al. Papaya seed represents a rich source of biologically active isothiocyanate. *J Agric Food Chem*,2007,55:4407-4413.
- Zhang L(张路),Wang CY(王春艳),Li SD(李士栋),et al. Optimization of extracting total catalpol from *Rehmannia glutinosa* Libosch. by response surface design. *Chin J Drug Eval*(中国药物评价),2015,32:12-16.
- Su N(苏楠),He XX(何羨霞),Feng Q(冯青),et al. Optimization of dilute acid ethanol extraction technology for 1-deoxynojirimycin from *Mori Folium* by response surface methodology. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志),2014,20(3):13-16.
- Lin SH(林水花),Wu JG(吴建国),Zheng YZ(郑燕芝),et al. Optimization of ultrasonic extraction of triterpenoid from the root of *Actinidia eriantha* by response surface analysis. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2014,26:431-437.
- Shen SA,Chen DJ,Li X,et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity of polysaccharides from leaves of *Paris polyphylla*. *Carbohydr Polym*,2014,104:80-86.